

## 多囊卵巢综合征患者白细胞中内质网应激标志物表达情况

刘碧娟, 魏锦虹, 陈志群 厦门大学附属第一医院思明分院妇产科, 福建 厦门 361004

**摘要:**目的 分析多囊卵巢综合征患者白细胞中内质网应激标志物的表达。方法 选取2017年10月-2018年8月收治的多囊卵巢综合征患者88例为观察组, 同期因输卵管异常或男方因素导致的不孕患者100例为对照组。采集患者外周静脉血, 检测性激素、空腹血糖及胰岛素、甲状腺功能指标、血脂指标; 分离白细胞, 应用RT-PCR检测免疫球蛋白结合蛋白(BIP)、C/EBP同源蛋白(CHOP) mRNA表达水平, 应用Western blot检测BIP、CHOP、氨基末端激酶(JNK)、p-JNK蛋白表达水平。结果 两组患者外周血雄烯二酮、性激素结合球蛋白、卵泡生成素、雌二醇、睾酮、空腹血糖、空腹胰岛素、HOMA-IR水平比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$ )。两组患者外周血游离三碘甲状腺原氨酸( $FT_3$ )、游离甲状腺素( $FT_4$ )、促甲状腺激素(TSH)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$ )。观察组BIP mRNA的相对表达量明显高于对照组( $P < 0.05$ ); 观察组CHOP mRNA的相对表达量与对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。观察组BIP、p-JNK蛋白相对表达量明显高于对照组(均 $P < 0.05$ ); 两组患者白细胞中CHOP、JNK蛋白相对表达量比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$ )。结论 多囊卵巢综合征患者白细胞中存在BIP、CHOP、p-JNK异常表达, 内质网应激与多囊卵巢综合征发生密切相关, 可通过活化JNK信号通路参与病情发展。

**关键词:** 多囊卵巢综合征; 白细胞; 内质网应激

中国图书分类号: R711.75 文献标识码: A 文章编号: 1001-4411(2019)23-5529-03; doi: 10.7620/zgfybj.j.issn.1001-4411.2019.23.68

多囊卵巢综合征是育龄期女性常见的内分泌代谢性疾病, 是排卵功能障碍引发不孕的主要原因, 发病率为8%~10%<sup>[1]</sup>。多囊卵巢综合征发病机制复杂, 涉及内分泌系统、神经系统、卵巢组织等多个方面<sup>[2]</sup>。内质网应激在胰岛素抵抗及多种代谢性疾病的发生、发展中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。氨基末端激酶(JNK)是内质网应激信号通路的主要成分<sup>[4]</sup>。免疫球蛋白结合蛋白(BIP)是内质网分子伴侣之一, 内质网应激发生时BIP表达上调<sup>[5]</sup>; 内质网应激通过未折叠蛋白质应答反应活化C/EBP同源蛋白(CHOP); BIP和CHOP被认为是内质网应激的主要标志物<sup>[6]</sup>。多囊卵巢综合征患者排卵障碍与体内白细胞功能异常有关<sup>[7]</sup>, 但白细胞中是否存在内质网应激目前仍未明确。本研究分析了多囊卵巢综合征患者白细胞中BIP、CHOP、JNK、p-JNK表达变化, 旨在探讨内质网应激与多囊卵巢综合征发病的关系。

### 1 对象与方法

**1.1 研究对象** 选取2017年10月-2018年8月收治的多囊卵巢综合征患者88例为观察组, 均符合多囊卵巢综合征鹿特丹诊断标准, 无相关治疗史, 患者年龄19~34岁, 平均年龄(25.93±3.71)岁; 体质指数19.61~26.95 kg/m<sup>2</sup>, 平均(22.68±3.91) kg/m<sup>2</sup>。收集同期因输卵管异常或男方因素导致的不孕患者100例为对照组, 年龄20~36岁, 平均年龄(25.59±4.10)岁; 体质指数19.42~27.15 kg/m<sup>2</sup>, 平均(22.42±3.55) kg/m<sup>2</sup>。两种患者一般资料差异无统计学意义(均 $P > 0.05$ )。本研究经医院伦理委员会审核批准, 患者均签署知情同意书。

**1.2 主要试剂** 逆转录试剂盒、PCR试剂盒购于上海翊圣生物科技有限公司; 鼠抗人BIP、CHOP单克隆

抗体 鼠抗人JNK、p-JNK单克隆抗体购于北京奥维亚生物技术有限公司; HRP标记的山羊抗鼠IgG购于上海合星生物科技有限公司; 性激素、甲状腺功能、血脂检测试剂盒购于江苏宝莱生物科技有限公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 外周血生化指标检测** 采集两组患者月经第3~5天的外周静脉血4 ml, 3 000转/min离心10 min(离心力2 300 g), 分离血清; 采用化学发光法检测性激素水平, 包括雄烯二酮、性激素结合球蛋白、卵泡生成素、雌二醇、睾酮; 采用氧化酶法检测空腹血糖水平; 采用化学发光法检测空腹胰岛素水平; 采用化学发光免疫法检测甲状腺功能指标; 采用免疫比浊法检测血脂指标。

**1.3.2 RT-PCR检测** 采集患者外周静脉血, 抗凝处理后加入红细胞溶血剂混合均匀, 3 000转/min离心2 min(离心力1 900 g), 收集白细胞, 采用Trizol法提取细胞总RNA, 逆转录得到cDNA。BIP上游引物序列5'-GTGGAGGGTGTCAAAGTTATGG-3', 下游引物序列5'-TCTGGG-GACTGTTTTCTGTTAG-3'; CHOP上游引物序列5'-TTCCTCTTTCCGTTACTGAGTC-3', 下游引物序列5'-GTCCTGTTACTTTGGTTTCACC-3'; 内参β-actin上游引物序列5'-AAGCACCTACTACGGTGTCCCT-3', 下游引物序列5'-CAGGTGGCGTTTACGAAG-3'。反应条件: 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共40个循环, 延伸72℃ 5 min。扩增产物行凝胶电泳, 计算BIP、CHOP mRNA的相对表达量。

**1.3.3 Western blot检测** 向白细胞中加入全蛋白提取液, 离心取上清, 采用BCA法进行蛋白定量, 收集目标蛋白, 行SDS-PAGE凝胶电泳, 经PVDF膜

转移, 封闭 2 h, 加入鼠抗人 BIP 单克隆抗体 (1 : 200 稀释)、鼠抗人 CHOP 单克隆抗体 (1 : 500 稀释)、鼠抗人 JNK、p-JNK 单克隆抗体 (1 : 500 稀释), 4℃ 过夜, 滴加 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG (1 : 2 000 稀释), 室温环境下静置 2 h, ECL 显色, 避光显影, 采集图像, 分析目标条带灰度值。

1.4 统计学分析 本研究所得数据均采用 SPSS 23.0 版统计学软件进行统计处理。计量资料以( $\bar{x} \pm s$ ) 的形式表示, 数据比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 两组患者外周血生化指标比较 两组患者外周血雄烯二酮、性激素结合球蛋白、卵泡生成素、雌二醇、睾酮、空腹血糖、空腹胰岛素、HOMA-IR 水平比较差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ )。两组患者外周血游离三碘甲状腺原氨酸 (FT<sub>3</sub>)、游离甲状腺素 (FT<sub>4</sub>)、促甲状腺激素 (TSH)、总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平比较差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 两组患者外周血生化指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	雄烯二酮(nmol/L)	性激素结合球蛋白(nmol/L)	卵泡生成素(U/L)	雌二醇(pmol/L)	睾酮(nmol/L)
观察组	88	11.75±4.59	35.59±16.14	5.41±1.39	290.37±115.61	1.96±1.13
对照组	100	6.02±1.87	56.91±19.37	6.50±1.97	184.49±68.43	1.02±0.28
<i>t</i> 值		18.256	26.694	10.831	31.960	13.037
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.008	0.000	0.004

组别	例数	空腹血糖(mmol/L)	空腹胰岛素(mU/L)	HOMA-IR	FT <sub>3</sub> (pmol/L)	FT <sub>4</sub> (pmol/L)
观察组	88	5.81±1.62	14.36±9.81	3.80±1.63	4.49±0.33	19.28±1.95
对照组	100	5.24±0.89	8.49±2.67	2.05±0.84	4.53±0.51	19.04±2.31
<i>t</i> 值		5.814	11.715	14.909	0.492	0.551
<i>P</i> 值		0.039	0.006	0.002	0.534	0.463

组别	例数	TSH(mU/L)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)
观察组	88	2.46±1.03	4.36±0.81	1.04±0.39	1.54±0.38	2.70±0.85
对照组	100	2.61±1.28	4.28±0.75	0.86±0.21	1.59±0.41	2.61±0.81
<i>t</i> 值		0.518	0.793	0.907	0.205	0.392
<i>P</i> 值		0.490	0.265	0.114	0.831	0.645

2.2 两组患者白细胞中 BIP、CHOP mRNA 表达比较 观察组 BIP mRNA 的相对表达量为 (2.51 ± 0.83), 明显高于对照组的 (1.18 ± 0.45), 差异有统计学意义 ( $t = 7.526, P = 0.030$ ); 观察组 CHOP mRNA 的相对表达量为 (0.81 ± 0.25), 与对照组 (0.73 ± 0.21) 比较差异无统计学意义 ( $t = 0.955, P = 0.128$ )。见图 1。

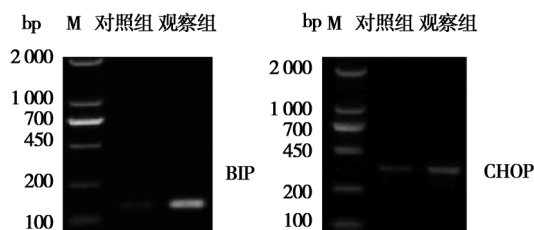


图 1 两组患者白细胞中 BIP、CHOP mRNA 电泳图

2.3 两组患者白细胞中 BIP、CHOP、JNK、p-JNK 蛋白表达比较 观察组 BIP、p-JNK 蛋白相对表达量明显高于对照组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); 两组患者白细胞中 CHOP、JNK 蛋白相对表达量比较差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ )。见

图 2、表 2。

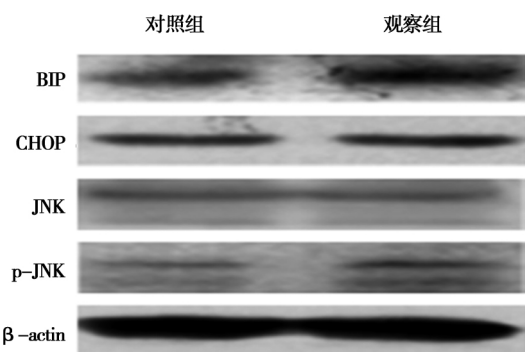


图 2 两组患者白细胞中 BIP、CHOP 蛋白电泳图

表 2 两组患者白细胞中 BIP、CHOP、JNK、p-JNK 蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	BIP	CHOP	JNK	p-JNK
对照组	88	0.63±0.15	1.09±0.15	0.46±0.09	0.67±0.11
观察组	100	1.91±0.23	1.13±0.19	0.44±0.07	0.84±0.20
<i>t</i> 值		15.465	0.775	0.193	7.351
<i>P</i> 值		0.001	0.290	0.841	0.024

### 3 讨论

真核细胞中内质网是蛋白质加工、合成的部位,在维持细胞内环境稳态中发挥重要作用<sup>[8]</sup>;在缺氧、理化因素等外界应激刺激下,内质网出现钙离子平衡失调、未折叠蛋白质应答反应,引起内质网应激反应,诱发细胞凋亡<sup>[9]</sup>。相关研究<sup>[10]</sup>显示:内质网应激是细胞的自我保护性机制,具有维持细胞生存和内质网稳态的作用,但长时间或高强度的内质网应激反应会导致细胞损伤、凋亡<sup>[11]</sup>。内质网应激介导胰岛素抵抗及代谢性疾病的发生与发展<sup>[12]</sup>。多囊卵巢综合征是育龄期女性常见的内分泌系统疾病,以胰岛素抵抗、高胰岛素血症、无排卵为主要临床表现,其发病机制目前尚未阐明。胰岛素抵抗可能为多囊卵巢综合征的病理基础,胰岛素抵抗引发的体内高水平雄激素、胰岛素对正常排卵造成不良影响<sup>[13-14]</sup>。本研究显示:多囊卵巢综合征患者雄烯二酮、雌二醇、睾酮、空腹血糖、空腹胰岛素、HOMA-IR明显高于对照组,性激素结合球蛋白、卵泡生成素明显低于对照组,提示多囊卵巢综合征患者体内存在不同程度的胰岛素抵抗、高雄激素、胰岛素血症。考虑到内质网应激引发胰岛素抵抗,而胰岛素抵抗是代谢性疾病的病理基础,本研究进一步分析了内质网应激与多囊卵巢综合征发生的关系。

本研究显示:观察组 BIP mRNA 和蛋白相对表达量均明显高于对照组,CHOP mRNA 和蛋白相对表达量较对照组有升高趋势,但无明显差异。内质网应激反应以 BIP、CHOP 表达上调为主要特征,提示多囊卵巢综合征患者白细胞中存在内质网应激反应。内质网应激反应启动后,早期 BIP 表达快速上调来发挥内质网的稳定功能,有助于细胞适应应激反应<sup>[15]</sup>;中后期随着应激反应时间的延长和程度的增加,引发内质网功能障碍,无法通过上调 BIP 表达来缓解内质网应激反应,激活 CHOP 通路等细胞凋亡途径,引发细胞死亡<sup>[16]</sup>。本研究提示:多囊卵巢综合征患者内质网应激反应处于早期阶段,以 BIP 表达上调为主要表现,未启动 CHOP 细胞凋亡途径。

内质网应激参与胰岛素抵抗及多种代谢性疾病的发病过程,存在胰岛素抵抗的女性脂肪组织中内质网应激通过激活 JNK 信号通路,引发炎症因子释放增加<sup>[17-18]</sup>。JNK 为 MAPK 家族成员,介导体内应激反应,也称为应激激活蛋白激酶<sup>[4]</sup>。目前研究<sup>[16]</sup>显示:JNK 是胰岛素作用的主要调节因子,JNK 活化介导了 2 型糖尿病及肥胖者体内胰岛素抵抗的发生。内质网应激反应可激活肌醇激酶,活化 JNK 信号通路<sup>[19-20]</sup>。本研究显示:观察组患者白细胞中 p-JNK 蛋白相对表达量明显高于对照组,提示内质网应激反应可通过激活 JNK 信号通路参与多囊卵巢综合征的发生与发展。

综上所述,多囊卵巢综合征患者白细胞中存在

BIP、CHOP、p-JNK 异常表达,内质网应激与多囊卵巢综合征发生密切相关,可通过活化 JNK 信号通路参与病情发展。

### 参考文献

- [1] 赵越,阮祥燕,李扬璐,等.来曲唑联合高纯度尿促性素治疗克罗米芬耐药的多囊卵巢综合征不孕患者的临床研究[J].首都医科大学学报,2016,37(4):431-436.
- [2] Agapova SE, Cameo T, Sopher AB, et al. Diagnosis and challenges of polycystic ovary syndrome in adolescence [J]. Semin Reprod Med, 2014, 32(3): 194-201.
- [3] 金婧,阮祥燕,华琳,等.多囊卵巢综合征卵巢储备功能降低患者肥胖及糖脂代谢特征[J].首都医科大学学报,2018,39(4):505-511.
- [4] 李扬璐,阮祥燕, Mueck AO, 等.多囊卵巢综合征对妊娠结局的影响研究进展[J].首都医科大学学报,2016,37(4):449-453.
- [5] 王利娟,阮祥燕,崔亚美,等.多囊卵巢综合征不同表型的血清抗苗勒管激素水平特征的分析[J].首都医科大学学报,2016,37(4):444-448.
- [6] 刘颖华,侯丽辉,徐芳,等.不同性激素结合球蛋白水平对多囊卵巢综合征患者的影响[J].实用医学杂志,2016,32(12):1969-1971.
- [7] 王雪,张翠莲,张少娣,等.体质量指数对多囊卵巢综合征患者移植优质胚胎后早期妊娠丢失的影响[J].实用妇产科杂志,2016,32(3):220-224.
- [8] 左莉.多囊卵巢综合征病因及治疗进展[J].重庆医学,2018,47(9):1247-1250.
- [9] 岳峰,许娟,李秀莲,等.多囊卵巢综合征患者高糖负荷后胰岛素抵抗的变化[J].中华糖尿病杂志,2016,8(2):108-112.
- [10] 康燕.多囊卵巢综合征不孕患者氯米芬与他莫昔芬治疗对性激素和妊娠的影响[J].中国计划生育学杂志,2018,26(10):932-936.
- [11] 余红英,熊燕.年龄及 BMI 对多囊卵巢综合征患者胰岛素抵抗和糖脂代谢的影响[J].山东医药,2016,56(1):66-68.
- [12] 章添悦,张翼飞,宁光,等.多囊卵巢综合征与雄激素作用有关易感基因的研究进展[J].中华内分泌代谢杂志,2018,34(10):895-898.
- [13] 黄爱洁,周莹,符金香,等.青春期多囊卵巢综合征的诊治进展[J].国际内分泌代谢杂志,2016,36(5):338-341.
- [14] 邹萍,董浩旭,黄冬梅,等.多囊卵巢综合征临床治疗的研究进展[J].华中科技大学学报(医学版),2016,45(5):588-592.
- [15] 江欢,李晓红,朱伟杰,等.多囊卵巢综合征不孕妇女抗精子抗体的评价[J].中国病理生理杂志,2018,34(8):1497-1500.
- [16] 涂铵素,钟影,毛照光,等.多囊卵巢综合征合并不孕症患者血清 TOS, TAS 水平变化及其与血浆载脂蛋白(a)的关系[J].南方医科大学学报,2016,36(3):405-409.
- [17] Battaglia C, Battaglia B, Morotti E, et al. Two and three dimensional sonographic and color Doppler techniques for diagnosis of polycystic ovary syndrome: the stromal/ovarian volume ratio as a new diagnostic criterion [J]. J Ultrasound Med 2012, 31(7):1015-1024.
- [18] 金婧,阮祥燕,华琳,等.多囊卵巢综合征卵巢储备功能降低患者肥胖及糖脂代谢特征[J].首都医科大学学报,2018,39(4):505-511.
- [19] 张郡,宿宓,许良智,等.炔雌醇环丙孕酮片与去氧孕烯炔雌醇片的长期应用对多囊卵巢综合征的疗效及代谢安全性[J].南方医科大学学报,2018,38(8):917-922.
- [20] 刘颖华,侯丽辉,徐芳,等.不同性激素结合球蛋白水平对多囊卵巢综合征患者的影响[J].实用医学杂志,2016,32(12):1969-1971.

收稿日期:2019-03-14 责任编辑:薛丽萍